

修 士 学 位 論 文

題 名

アメフラシの食物嗜好性における連合学習の関与の検討

指 導 教 授

黒 川 信

准 教 授

平 成 2 9 年 1 月 1 0 日 提 出

首都大学東京大学院

理 工 学 研 究 科

生 命 科 学

専 攻

学 修 番 号 1 5 8 8 1 3 2 6

氏 名 富 田 千 景

アメフラシの食物嗜好性における連合学習の関与の検討

神経生物学研究室 富田 千景

軟体動物腹足類のアメフラシ(*Aplysia kurodai*) は海藻食で、成体はアオサやワカメを好んで摂食し、テングサは摂食忌避するとされている。アメフラシは後触角で海藻の匂いを感知すると、腹足の前部分を持ち上げる摂食姿勢をとり、首を振って海藻のありかを探す。海藻により誘起される摂食に向けた行動を **Food arousal** という。前触角や口唇が実際に海藻に接触しその化学刺激を感知すると、口を開いて歯舌を口球から突き出して海藻をつかみつつ引き込み、口を閉じて摂食する (摂食行動)。また、忌避する海藻が口唇に接触すると歯舌を引き込むと同時に閉口して海藻を吐き出す (摂食忌避行動)。成体のアメフラシでは海藻の抽出液を口唇に与えた際も海藻を与えた時と同様の反応が誘発されるため、これらは化学刺激を受容した結果起こるとされる。

一方予備的実験より、テングサの生育が見られない地域で採集したアメフラシの中に成体でもテングサに摂食忌避を示さない個体があった。一般に食物選択に関与する刺激は化学刺激のみとは限らない。同じ腹足類のモノアラガイでは、好物のショ糖とともに防御反応を誘起する体表接触刺激を与えるとショ糖を摂食しなくなる味覚嫌悪の連合学習が知られている。柔らかいシート状のアオサやワカメに比べ、テングサは細かく枝分かれした硬い海藻である。アメフラシの食物選択においても、機械刺激が摂食忌避を誘起するのであれば、化学刺激と機械刺激を連合学習した結果テングサの化学成分のみで忌避が生じる可能性が考えられる。

本研究では、テングサ葉体の経験がないと考えられる個体に対するテングサ葉体のトレーニングと、アオサの化学刺激と硬い機械刺激を組み合わせる連合学習実験を行い、摂食における学習の効果を検証した。実験では、摂食の前段階である **Food arousal** の発

現をその海藻を好むか否かの指標とし、海藻の一片で後触角、前触角および口唇を刺激する Food arousal テストを、トレーニングの前後に行った。

テングサ葉体に対する Food arousal テスト(pre) を 13 個体に対して各 3 回ずつ行ったところ、3 回とも Food arousal が起きた個体が 4 個体、2 回 Food arousal が起きた個体が 5 個体観察された。テスト(pre) で Food arousal が観察されたうちの 4 個体に対して、24 時間飼育水槽内でテングサ葉体に自由にアプローチさせるトレーニングを行ったところ、テスト(post)では 4 個体とも全てのテストで Food arousal を示さなくなった。トレーニング 4 日後も 4 個体とも全てのテストで Food arousal を示さないままだった。

アオサ抽出液を付着させた引きちぎり辛い人工餌料であるアオサシートと、たやすく引きちぎれるアオサ葉体を使用し、機械刺激の違いで化学刺激に対する反応に差が生じるかを検証した。アオサシート(トレーニング群) またはアオサ葉体(コントロール群) へ 1 時間自由にアプローチさせることをトレーニングとした。1 日あたり 3 回のトレーニングを 1 時間の rest を挟んで行い、これを 3 日間繰り返すトレーニングシリーズを行ったところ、テスト(post) ではトレーニング群の 12 個体中 9 個体では Food arousal が一度も観察されなかった。なお、コントロール群ではテスト(post) で food arousal を示さなくなった個体はいなかった。トレーニングシリーズ 7 日後にもテストを行ったところ、テスト(post) で Food arousal を示さなかった 9 個体中 3 個体が Food arousal を示さないままだった。

以上の結果から、生得的にはテングサの化学刺激は摂食行動を誘発されること、機械刺激との連合学習により化学刺激で摂食行動が起こらなくなることが示唆された。条件付けの長期の効果については今後、追加実験による再検討が必要である。

Possible involvement of associative learning in food preference in *Aplysia kurodai*

Chikage Tomita

Aplysia kurodai, gastropod molluscs, feeds on seaweeds. It has been reported that adult *Aplysia* usually feeds well on *Ulva* and *Undaria*, but it does not eat *Gelidium*. When the animals sense smell of favorite seaweeds with their rhinophores, they lift up their anterior pedal from substrate to show feeding posture, wave their head to search for the seaweed leaves. This food-induced arousal state that occurs following exposure of *Aplysia* to seaweeds is called food arousal. When *Aplysia* actually touches seaweed leaves and senses its taste with their anterior tentacles and/or lips, it opens the jaw, protracts radula from buccal to catch the leaves with the radula, retracts the radula and then close the jaw to complete ingestion. When *Aplysia* touches seaweed leaves which it dislikes, it rejects the leaves by closing the jaw as soon as retraction of the radula to egest them. In adult animals, it has been reported that we can induce the rejection response by application of seaweed extract on their lips as well as by seaweed leaves, so it is generally believed that chemical stimuli induces this response.

I found in some preliminary observation, however, that adult *Aplysia* which inhabited in the ocean where *Gelidium* was rarely found to grow didn't show rejection response to *Gelidium*. Generally, food preference is not only dependent on chemo-sensation but also on mechano- or other sensations. Additionally in another gastropod species, *Lymnaea stagnalis*, favorite sucrose taste associated with noxious tactile stimuli causes the taste aversion learning, in which the animal was changed to be averse to sucrose. *Ulva* and *Undaria* leaves, on which *Aplysia* feeds,

are flat and soft, whereas *Gelidium* leaves, which adult *Aplysia* rejects to eat, are hard with fine spiny branch. Therefore, there is a possibility that associative learning processes might be involved in the food preference in *Aplysia*, as shown in the following hypothesis; inherently favorite taste of *Gelidium* associated with tactile stimuli by its leaves might causes the taste aversion learning, in which *Aplysia* would change to be averse to the taste of *Gelidium*.

In this study, in order to examine possibility of involvement of associative learning in food preference in *Aplysia*, I conducted two types of conditioning experiments as follows. In animals that might have not encountered *Gelidium*, *Gelidium* leaves were put in the home tank for 24 hours as an associated training between the chemical and mechanical stimuli due to *Gelidium* (Experiment 1). In the other conditioning experiment, I used an artificial hard *Ulva* leaves (hard sheet coated with *Ulva* taste), which exert both favorite chemical of *Ulva* taste and hard mechanical stimuli (Experiment 2). Occurrence of food arousal was tested because it is a first step of feeding behavior and can be considered to indicate food preference. Food arousal tests were performed before and after training three to four times, in which I observed whether the arousal was induced in response to stimulation applied to the rhinophores, anterior tentacles and/or lips with a piece of seaweed leaf.

In pre-conditioning tests for experiment 1, *Gelidium* leaves were applied three times and I observed if the food arousal was induced or not. 4 of 13 animals showed arousal in all three tests, and 5 of 13 showed in two times of the three. Only 3 animals showed no arousal.

4 animals which had shown arousal in the pre-conditioning test were conditioned by keeping in the home tank including *Gelidium* for animals to approach freely. All the

conditioned animals did not show arousal at all in the following three food arousal tests by *Gelidium* just after and 4 days after the training.

In the pre-conditioning test for experiment 2, *Ulva* leaves were applied four times. I used animals which showed arousal in the pre-conditioning test by *Ulva* for conditioning. 12 animals (training group) were conditioned by keeping in the experimental containers including artificial hard *Ulva* leaves for animals to approach freely for 1 hour at every 2 hours, 3 times per day, for three days (training). 5 animals were conditioned by keeping in there including *Ulva* leaves in the same manner as for the training group (control group). 9 of 12 conditioned animals did not show arousal at all in the following four food arousal tests by *Ulva*. 3 of 9 animals which had not shown arousal did not show arousal 7 day after the training.

The results suggest that *Aplysia* feeding behavior is induced by taste of *Gelidium* inherently, whereas it is not induced by *Gelidium* chemical stimuli after associative learning between mechanical and chemical stimuli exerted by *Gelidium*, although long-term effects of the conditioning remains to be examined.

目次

序論	1
材料および方法.....	3
結果	6
1 テングサ葉体での学習実験	
Food arousal テスト(pre)	
トレーニング	
Food arousal テスト(post)	
2 アオサシートでの連合学習実験	
Food arousal テスト(pre)	
Food arousal テスト(post)	
考察	9
1 テングサ葉体に対する食性と学習	
採集前の生息環境下でのテングサ経験の有無	
テングサ葉体の学習	
2 学習と嗜好の決定	
アオサシートでの連合学習実験	
3 Food arousal の判定について	
4 連合学習の長期記憶化	
謝辞	14
参考文献	15
図および図の説明	

序論

軟体動物腹足類のアメフラシ類は海藻食で、種ごとに異なる食物選択性があることが知られている(Carefoot 1967, 1970)。たとえば、*Aplysia californica* はユカリ (*Plocamium*)とソゾ (*Laurencia*)を好んで食べるが、テングサ (*Gelidium*)は摂食しない (Kupfermann and Carew 1974; Audesirk 1975)。*Aplysia juliana* (和名: アマクサアメフラシ) はアオサ (*Ulva*)を摂食するが、ソゾを摂食しない (Carefoot 1970)。*Aplysia kurodai* (和名: アメフラシ) ではアオサやワカメ (*Undaria*)を摂食し、テングサは摂食しないことが知られている。そして、摂食行動と摂食忌避行動は、関与するニューロン群と筋肉群は共通だが、味覚受容により脳神経節内の CPG (Central Pattern Generator) に含まれる単一のニューロンである CB_M1 の活動性が変化することで切り替わることが、*Aplysia kurodai*を用いた研究により明らかにされている (Nagahama *et al.* 1987, 1988, 1989, 1990)。

一方予備的実験より、テングサの生育が見られなかった地域で採集したアメフラシの中には成体でもテングサに摂食忌避を示さない個体があった (富田, データは示さない)。一般に食物選択に関与する刺激は化学刺激のみとは限らない。同じ腹足類のモノアラガイでは、好物のショ糖とともに防御反応を誘起する体表接触刺激を与えるとショ糖を摂食しなくなる味覚嫌悪の連合学習が知られている (Ito *et al.* 1999)。柔らかいシート状のアオサやワカメに比べ、テングサは細かく枝分かれした硬い海藻である (Kamiya 2012)。アメフラシの食物選択においても、機械刺激が摂食忌避を誘起し、化学刺激と機械刺激を連合学習した結果テングサの化学成分のみで忌避が生じる可能性が考えられる。

アメフラシ類は中枢神経系のニューロン細胞体直径が比較的大きいことから、従来よ

り動物の行動や記憶・学習の神経機構の細胞レベルでの研究のモデル生物として世界的に用いられている(Kandel, 1979)。学習のニューロンモデルとして知られている鰓や尾の引き込み反射(Kandel et al. 1991)は単シナプス反射による行動であるのに対し、摂食行動はより複雑なニューロン回路が関与する行動であり、その多シナプスニューロン回路が解明されている(Cohen et al. 1978; Rosen et al. 1991)。その摂食行動における摂食と摂食忌避が学習によって変化することが明らかになれば、複雑な回路により発現する行動での学習のニューロン機構解明のモデルとなる可能性がある。そこで、本研究では摂食における学習の効果を検証することを目的とした。テングサ葉体の経験がないと考えられる個体に対するテングサ葉体のトレーニングと、アオサ成分を付着させた人工餌料を使用しアオサの化学刺激と硬い機械刺激を組み合わせる連合学習実験をそれぞれ行った。実験では摂食の前段階である Food arousal (Susswein et al. 1978) の発現の有無をその海藻を好むか否かの指標とし、海藻の一片で後触角、前触角および口唇を刺激する Food arousal テストを、トレーニングの前後に行った。

材料および方法

1 材料

材料には、アメフラシ (*Aplysia kurodai*) を使用した。動物は、神奈川県横浜市金沢区沿岸、神奈川県足柄下郡真鶴町沿岸、福島県小名浜市沿岸から採集した。採集した動物は、水温 15～16 °C の自然海水で満たしろ過とエアレーションを施した水槽で、仕切りで 1 匹ずつに分けて維持し、エサとしてワカメを与えた。L : D = 12 : 12 で明期は 9～21 時であった。実験には 50～260 g の若い個体を使用し、実験前に 1～3 日間絶食させた。実験は全て明期に行った。

海藻は、アオサ (*Ulva*)、テングサ (*Gelidium*)、ワカメ (*Undaria*) の 3 種類を使用した。アオサは神奈川県横浜市金沢区沿岸で採集し冷凍保存したものを、テングサは東京都伊豆大島で潜水漁師に採集してもらって冷凍保存したものを、ワカメは「華生ワカメ」(ヤマニ) を冷蔵保存したものを使用した。

アオサを乾燥させて砕いた粉末と DW を混合して作製したアオサ抽出液に、普通セロファン紙を漬けて乾燥させることで、アオサの化学成分をシートの表面に付着させた餌料(アオサシート)を準備した。アオサシートの大きさはおよそ $2 \times 8 \text{ cm}^2$ である。アオサ抽出液は、乾燥アオサ 0.7 g : DW 24.3 g で調整した。抽出液の濃度は、アメフラシの口唇に与えた際に摂食行動が観察された濃度である。

2 行動実験

Food arousal テスト

摂食の前段階の行動である Food arousal(Susswein *et al.* 1978)を、海藻を好むか否かの指標として用いた。Food arousal 判定基準として、①腹側の前部分を持ち上げる摂食姿勢、②小刻みの首振り運動、③口唇を露出、④海藻の位置へ口唇を近づける動き の4つの行動の発現を用いた。海藻の一片で後触角、前触角および口唇を、反応が起こるまで（最大3分間）接触刺激し、刺激開始から3分以内に以下に示す「Food arousal の判断基準」の①ないし②を開始したのち、全ての判断基準を満たした場合に Food arousal が起きたと判定した。Food arousal テストは、500 ml の実験容器（デボジカップ）にアメフラシを移動させて行った。Food arousal テストを行う際には、対照としてエサとして与えているワカメでのテストも共に行い、ワカメでは Food arousal が起こることを確認した。

2-1 テングサ葉体での学習実験

テングサ葉体での Food arousal テスト(pre)を13個体に対して各3回ずつ行った。テスト(pre)でテングサ葉体に対する Food arousal が観察されたうちの4個体に対して、24時間飼育水槽内でテングサ葉体へ自由にアプローチさせるトレーニングを行った (Fig. 3)。

テングサ葉体でのトレーニング終了にテスト各個体3回ずつ行い、テスト(pre)の結果と比較した (Fig. 4)。トレーニング終了1, 2, 3時間後に行ったテスト(post)で学習の短期的効果を観察し、トレーニング4日後に行ったテスト(4day)で学習の長期的効果を観察した。

2-2 アオサシートでの連合学習実験

テスト(pre)を各個体 4 回ずつ行い、アオサ葉体に対する Food arousal の有無を判定した。トレーニングはテスト(pre)で Food arousal が確認された個体に対して行った。トレーニング群ではアオサシートに、コントロール群ではアオサ葉体へ 1 時間自由にアプローチできる状態におき、これをトレーニングとした。1 回のトレーニングの時間は、テングサ葉体の摂食を試みた後にテングサ葉体の元から移動するまでの時間が 17~40 分であったという予備的観察結果から、それを充分満たす時間として 1 時間を設定した。トレーニング間の rest は、食べ物刺激で起こる口球や咽頭の自発活動は口部を wash 後 40~60 分で刺激前と同様の頻度に戻るとの記述(Nagahama 1987)を元に、前のトレーニングの影響が出ない 1 時間と設定した。1 日当たり 3 回のトレーニングを 1 時間の rest を挟んで行い、これを 3 日間繰り返して計 9 回のトレーニングを行った。この一連のトレーニングをトレーニングシリーズと呼ぶ。トレーニングはアメフラシを 500 ml の実験容器に移して行った(Fig. 5)。

アオサ葉体でのトレーニング終了にテストを各個体 3 回ずつ行い、テスト(pre)の結果と比較した(Fig. 6)。トレーニング終了 1 日後に行ったテスト(post)で学習の短期的効果を観察し、トレーニング 7 日後に行ったテスト(7day)で学習の長期的効果を観察した。

結果

1 テングサ葉体での学習実験

テングサ葉体の経験がないと考えられるアメフラシにおけるテングサ葉体に対する嗜好性を検証するため、Food arousal テスト(pre)を行った。テスト(pre)で Food arousal が 2 回以上確認されたうちの 4 個体に対して、テングサ葉体へ自由にアプローチさせるトレーニングを行った。トレーニング後にテングサ葉体に対する嗜好性が変化したかを検証するためテスト(post)を行った。

Food arousal テスト(pre)

13 個体に対して各 3 回ずつ、テングサ葉体を後触角、前触角および口唇に接触させ、摂食行動の前段階である Food arousal の有無で嗜好性を判定するテストを行った。その結果、一度も Food arousal を示さない個体が 3 個体、1 回 Food arousal を示した個体が 1 個体、2 回 Food arousal を示した個体が 5 個体、3 回とも Food arousal を示した個体が 4 個体観察された(Fig. 4)。

Food arousal を示した個体では多くのケースで、海藻接触開始から 3 分以内に Food arousal 判定基準の全てを満たした。Food arousal を示さなかった個体では、テングサ葉体を後触角および前触角に接触させても全く反応しないという反応、テングサ葉体を口唇に接触させても頭部が定位しない反応などが観察された。

トレーニング

飼育水槽下で 24 時間自由にテングサ葉体へアプローチさせることをトレーニングとした。トレーニング期間にはアメフラシがテングサの摂食を試みる行動が観察された。テングサ葉体に対して Food arousal が起こり、テングサ葉体に口唇を近づけた後、開

口して歯舌でテングサ葉体をつかんで引き込み、閉口した。テングサ葉体を口球内に取り込んだ状態で1~3分程静止したのち、テングサ葉体を吐き出した。テングサ葉体は噛み切られていなかった。この一連の摂食試行を2~10分ごとに繰り返したのち、テングサ葉体がある場所から移動した。最初にテングサ葉体を歯舌で引き込んだ時から、移動してテングサ葉体がある場所から離れるまで(コンタクト)の時間はおよそ17~40分だった。1回目のコンタクトの後に2回目、3回目のコンタクトが起こった。

Food arousal テスト(post)

トレーニングを行った4個体に対して、トレーニング終了後に各個体3回(1, 2, 3時間後) Food arousal テスト(post)を行った。その結果、4個体とも一度も Food arousal を示さなかった(Fig. 4)。テングサ葉体を接触させると後触角および前触角が縮こまり、その状態がテングサ葉体の接触している間中続いた。

トレーニング4日後も、4個体とも一度も Food arousal を示さなかった(Fig. 3)。後触角および前触角にテングサ葉体を接触させると摂食姿勢と小刻みな首振り運動が起こったが、口唇にテングサを接触させると首を振ってテングサ葉体から遠ざかる反応が観察された。

2 アオサシートでの連合学習実験

テスト(pre)でアオサ葉体に対する Food arousal が確認された個体に対して、アオサシート(アオサの抽出液を付着させた引きちぎりにくい人工餌料)に自由にアプローチさせるトレーニングを行った(トレーニング群)。コントロールとして、トレーニング群と同条件でアオサ葉体に自由にアプローチさせた(コントロール群)。トレーニング後にテスト(post)を行いアオサへの嗜好性が変化したかを検証した。

Food arousal テスト(pre)

テスト(pre)では、アオサ葉体に対して Food arousal を示す個体を選別した。18 個体に対して各 4 回ずつアオサ葉体に対するテスト(pre)を行った結果、17 個体で Food arousal が 4 回とも観察された(Fig. 6)。多くのケースでは海藻接触開始から 3 分以内に Food arousal の判定基準を満たした。なお、Food arousal が観察されなかった 1 個体は実験に使用せずデータから除外した。

Food arousal テスト(post)

トレーニング群の 12 個体のうち 9 個体は、テスト(post)で Food arousal が一度も観察されなくなった(Fig. 6)。コントロール群(N = 5)ではテスト(post)で Food arousal を示さなくなった個体は見られなかった。Food arousal が観察されなかった個体では、アオサ葉体を後触角および前触角に接触させても全く反応しないという反応、アオサ葉体を後触角および前触角に接触させた後に摂食姿勢をとったが小刻みな首振り運動と口唇の露出が見られなかった反応、口唇にアオサ葉体を接触させると首を振ってアオサ葉体から遠ざかった反応などが観察された。

テスト(post)でアオサ葉体に Food arousal を示さなかった 9 個体に対しトレーニング 7 日後にもテストを行ったところ、3 個体で Food arousal が一度も観察されなかった(Fig. 6)。口唇にアオサ葉体を接触させても頭部の定位が確認できなかった。

考察

1 テングサ葉体に対する食性と学習

採集前の生息環境下でのテングサ経験の有無

実験個体において、採集時に交尾中または産卵中の個体と、飼育中に産卵する個体は認められなかった。また、*Aplysia kurodai* と adult が同程度のサイズである *Aplysia californica* において実験室内で受精卵から成体までの成長を解析した結果 (Kriegstein, 1974) によると、今回使用した 50~260 g のアメフラシは juvenile (幼若期) に含まれる。juvenile 以前、変態前のベリジャー幼生期は外洋を遊泳して繊毛で単細胞性の藻類や珪藻の摂食を行っており、海藻の摂食が始まるのは変態後の juvenile 以降である (Kriegstein, 1974; Eales, 1921)。今回のアメフラシの採集はおそらくテングサが生育していないと考えられる以下①~③の場所を選んで行った。①神奈川県横浜市金沢区の海の公園は人工の砂浜と岩礁で構成されている遠浅の海で、ほとんどの区域はテングサの生育がよく見られる水深よりも浅い。②神奈川県足柄下郡真鶴町では、テングサが生育しないタイドプールの高潮帯域で採集を行った。③福島県いわき市小名浜は寒流が流れる地域で、一般的には暖海に生息するテングサの生息域からは外れており、漁獲データからもテングサの漁獲は確認できない (Kamiya, 2012; 福島県水産科, 2010-2015)。海藻の植生調査は行っていないが、採集した環境を目視で確認した限りではテングサは確認されなかった。

テングサ葉体の学習

13 個体に対してテスト(pre)を 3 回ずつ行ったところ、2 回以上 Food arousal が起きた個体は 9 個体観察された。テスト(pre)で Food arousal が観察された 4 個体にトレーニングを行ったところ、トレーニング後にテングサ葉体に対する Food arousal が一度も観察されなくなった。テングサが生育している地域 (淡路島) のアメフラシでは、テ

ングサ葉体の一片を口の中に押し込むと、90 %以上で吐き出し行動が観察されることが明らかになっている(Nagahama. 1987)。そして、予備的実験において、テングサを原料として作られる柔らかい寒天を 7 匹に与えて摂食するかをテストしたところ、6 匹が摂食することを観察した。これらのことから、生得的にテングサの摂食が起こらないのではなく、テングサの経験によって摂食が起こらなくなる可能性が示唆された。

テスト(pre)において、一度も Food arousal が観察されなかった個体は 200 g, 208 g, 255 g、Food arousal が 2 回ないし 3 回観察された個体は 110～260 g だった。従って個体の成長度によって結果に差が生じる傾向は特に認められなかった。

各 3 回ずつのテスト(pre)において、13 個体中 9 個体が 2 回以上テングサ葉体に対する Food arousal を示したとはいえ、一度も Food arousal を示さない個体が 3 個体観察された。このことから、今回の実験個体の生息域にテングサがあり、すでにテングサを経験していた個体が今回の実験で Food arousal を示さなかった可能性も考えられる。しかし、今回の実験ではテングサへの Not arousal が生得的である可能性を捨てきれない。今後の実験では、テングサへの Not arousal が生得的か学習であるかを決定するために、採集地の植生調査を行ってテングサの経験の有無をより厳密に検証する必要がある。一番良い方法は、テングサの生育がないことを調査により確認できたタイドプールにて変態直後の個体を採集し実験に用いること、あるいは受精卵から飼育した個体を実験に用いることだ。

2 学習と嗜好の決定

アオサシートでの連合学習実験

採集地でアオサの生育が確認されたことからアオサを摂食して成長したと考えられ、テスト(pre)で毎回 Food arousal を示した個体に対してアオサシートでの学習を行った

ところ、12 個体のうち 9 個体ではテスト(post)で Food arousal が一度も観察されなくなった。一方コントロール群ではテスト(post)で Food arousal を示さなくなった個体はいなかった。この結果から、好む海藻の化学刺激であっても、硬い機械刺激との連合学習の結果、Food arousal が起こらなくなる可能性が示唆された。

トレーニング群におけるテスト(post)で、Food arousal を示した個体は 149 g, 202 g, 208 g で、Food arousal を示さなかった個体は 130~255 g であった。従って、個体の成長度によって結果に差が生じる傾向は特に認められなかった。

テングサは一般的にアメフラシが摂食忌避することが知られているが、テングサが生育しないと考えられる地域で採集したアメフラシでは Food arousal を示す個体が観察された。そして、テングサへのトレーニングを行ったところ、テングサへの Food arousal を示さなくなったことを観察した。また、アメフラシが好んで摂食することが知られ、実際に Food arousal と摂食が観察されたアオサでも、機械刺激との連合学習実験後に Food arousal が起こらなくなることを観察した。これらの結果より、食物嗜好性の少なくとも一部は学習の結果である可能性が考えられる。今後の実験では、Not arousal が機械刺激との連合学習の結果起こったかどうかをより厳密に確かめるために、pure、機械刺激のみ、海藻の化学刺激のみ、ランダム等のコントロール群での動向を調べる必要がある。

また、今回の実験では餌料の機械的性質の定量化を行っていない。そのため、今後は押込み硬さや引張応力等の測定によって定量化を行い、餌料の機械的強度と摂食行動発現との関係を厳密に調べる必要がある。

3 Food arousal の判定について

今回の実験では、摂食行動が起こる直前に見られる「④海藻の位置へ口唇を近づける行動」を Food arousal 判定の基準に含め、①～④の全ての基準を満たした場合に Food arousal と判定した。しかし、実際には NA(Not Arousal)と判定した中には段階的な違いが見られた。葉体を後触角および前触角に接触させても全く反応しないという反応、葉体を後触角および前触角に接触させた後に摂食姿勢をとったが小刻みな首振り運動と口唇の露出が見られなかった反応、口唇に葉体を接触させても頭部の定位が起こらなかった反応、口唇に葉体を接触させると首を振って葉体から遠ざかった反応などが観察されたが、これらはいずれも基準を全て満たさないため NA と判定した。今後の実験では NA の詳細を分類することによって、摂食忌避が成立するまでの段階的变化を明らかにすることができると思う。

4 連合学習の長期記憶化

テングサ葉体トレーニング後のテスト(4day)では、テスト(post)と同様に 4 個体中 4 個体で Food arousal が観察されず、連合学習の長期記憶化が示唆された。一方、アオサシートトレーニング後のテスト(7day)では、テスト(post)で Food arousal が観察されなかった 9 個体中 3 個体では Food arousal が観察されず、連合学習の長期記憶化が示唆された。

テングサ葉体によるトレーニングは、予備の実験よりトレーニング開始から 1 時間以上経過した後にも 2 回目以降のコンタクトを行っている個体を観察したことから、24 時間連続して行った。また、アオサ葉体でのトレーニングは、spacing effect(Hintzman 1974; Mauelshagen *et al*, 1998)による学習の長期記憶化を目的としたことから、コンタクト 1 回の所要時間を充分満たす 1 時間を 1 回のトレーニング時間とした。そして、トレーニング間の rest を、食べ物刺激で起こる口球や咽頭の自発活動は口部を wash 後 40～60 分で刺激前と同様の頻度に戻るとの記述(Nagahama 1987)を元に、前のトレーニングの影

響が出ない 1 時間と設定した。

アオサシートでの spaced training 後のテスト(7day)よりもテングサでの massed training 後のテスト(4day)のほうが、連合学習の効果が長く続く傾向があるように考えられる。この違いが生じる要因として、トレーニング後の日数の違い、餌料の機械刺激の違い、トレーニングのプロトコルが異なることによるコンタクトの頻度の違いなどが考えられる。トレーニングのプロトコルによる差を比較するためには、今後の実験でトレーニング後のテストの日数の条件を揃えること、同じ餌料にて spaced training と massed training の両方を行うことが必要である。また、コンタクトの頻度が長期記憶成立に与える影響を調べるためには、トレーニング中のコンタクトを解析する必要がある。今回の実験ではトレーニング中のコンタクトの回数とその所要時間の定量化を一部でしかおこなえていない。今後の実験ではビデオ解析等によってトレーニング中のコンタクト時間・回数の定量化を網羅的に行い、コンタクト時間・回数と学習効果との関係性を調べることによって、学習の推移と成立条件を明らかにすることができると考える。

謝辞

本研究を進め、論文を作成するに当たり、終始丁寧に辛抱強くご指導くださいました神経生物学研究室准教授 黒川信先生に厚く御礼申し上げます。そして、研究および論文作成の際に貴重なご助言ご協力をいただきました、同研究室客員研究員 矢崎育子先生、同研究室 坪尚義さん、奥溪真人さん、今泉典子さん、朱顔さん、榎本萌花さん、実験動物を採集、提供してくださいました同研究室 近藤日名子さん、テングサを採集、提供してくださいました伊豆大島漁師 白井孝さんに厚く御礼申し上げます。

参考文献

- Audesirk T E (1975) Chemoreception in *Aplysia californica*. I. behavioral localization of distance chemoreceptors used in food-finding. Behav Biol 15: 45-55
- Carefoot T H (1967) Growth and nutrition of three species of opisthobranch molluscs. Comp Biochem Physiol 21: 627-652
- Carefoot T H (1970) A comparison of absorption and utilization of food energy in two species of tropical *Aplysia*. J Exp Biol Ecol 5: 47-62
- Cohen J L, Weiss K R, and Kupfermann I (1978) Motor control of buccal muscles in *Aplysia*. J Neurophysiol 41(1): 157-180
- Eales N B (1921) L.M.B.C *Memoirs* XXIV, *Aplysia*. Liverpool Biological Society.
- Hintzman D L (1974) Theoretical implications of the spacing effect. the Loyola symposium: 77-99
- Ito E, Kobayashi S, Kojima S, Sadamoto H, and Hatakeyama D (1999) Associative learning in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. Zool Sci 16(5):711-723. 1999
- Kamiya M (2012) 海藻 日本で見られる 388 種の生態写真+おしば標本. 誠文堂新光社. 14-15, 96, 154-155, 242-244
- Kandel E D (1979) Behavioral biology of *Aplysia*. W.H. Freeman and Co., San Francisco: 463
- Kandel E D, Schwartz J H, Jessell T M (1991) Principles of neural science third edition Appleton&Lange
- Kriegstein A R, Castellucci V, and Kandel E R (1974) Metamorphosis of *Aplysia californica* in laboratory culture. Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol.71, No.9: 3654-3658

Kupfermann I, Carew T J (1974) Behavior patterns of *Aplysia californica* in its natural environment. Behav Biol 12: 317-337

Mauelshagen J, Sherff C M, Carew TJ (1998) Differential induction of long-term synaptic facilitation by spaced and massed applications of serotonin at sensory neuron synapses of *Aplysia californica*

Nagahama T, Tanaka M (1987) Food-induced firing patterns in motoneurons innervating the pharynx of *Aplysia kurodai*. J Comp Physiol A 161: 799-809

Nagahama T, Shin N (1998) Patterned jaw movements and the motor neuron activity during rejection of seaweed in *Aplysia kurodai*. J Comp Physiol A. 182: 551-562

Nagahama T, Tanaka M (1989) Neural mechanism generating firing patterns in jaw motoneurons during the food-induced response in *Aplysia kurodai*. J Comp Physiol A. 166: 143-150

Nagahama T, Tanaka M (1990) Neural mechanism generating firing patterns in jaw motoneurons during the food-induced response in *Aplysia kurodai*. J Comp Physiol A 166: 277-286

Nagahama T, Tanaka M (1990) Innervation of buccal muscles by multifunctional MA1 neurons in *Aplysia kurodai*. J Comp Physiol A 167: 1-10

Rosen S C, Teyke T, Miller MW, Weiss KR, and Kupfermann I (1991) Identification and characterization of cerebral-to-buccal interneurons implicated in the control of motor programs associated with feeding in *Aplysia*. J Neurosci 11(11): 3630-3655

Susswein A J, Weiss K R, and Kupfermann I (1978) The effects of food arousal on the latency of biting in *Aplysia*. J Comp Physiol A. 123, 31-41

Susswein A J, Schwarz M, and Feldman E (1986) Learned changes of feeding behavior in *Aplysia* in response to edible and inedible foods. J Neurosci. 6(5): 1513-1527

福島県農林水産部水産科 福島県海面漁業漁獲高統計 (2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015)

Fig. 1

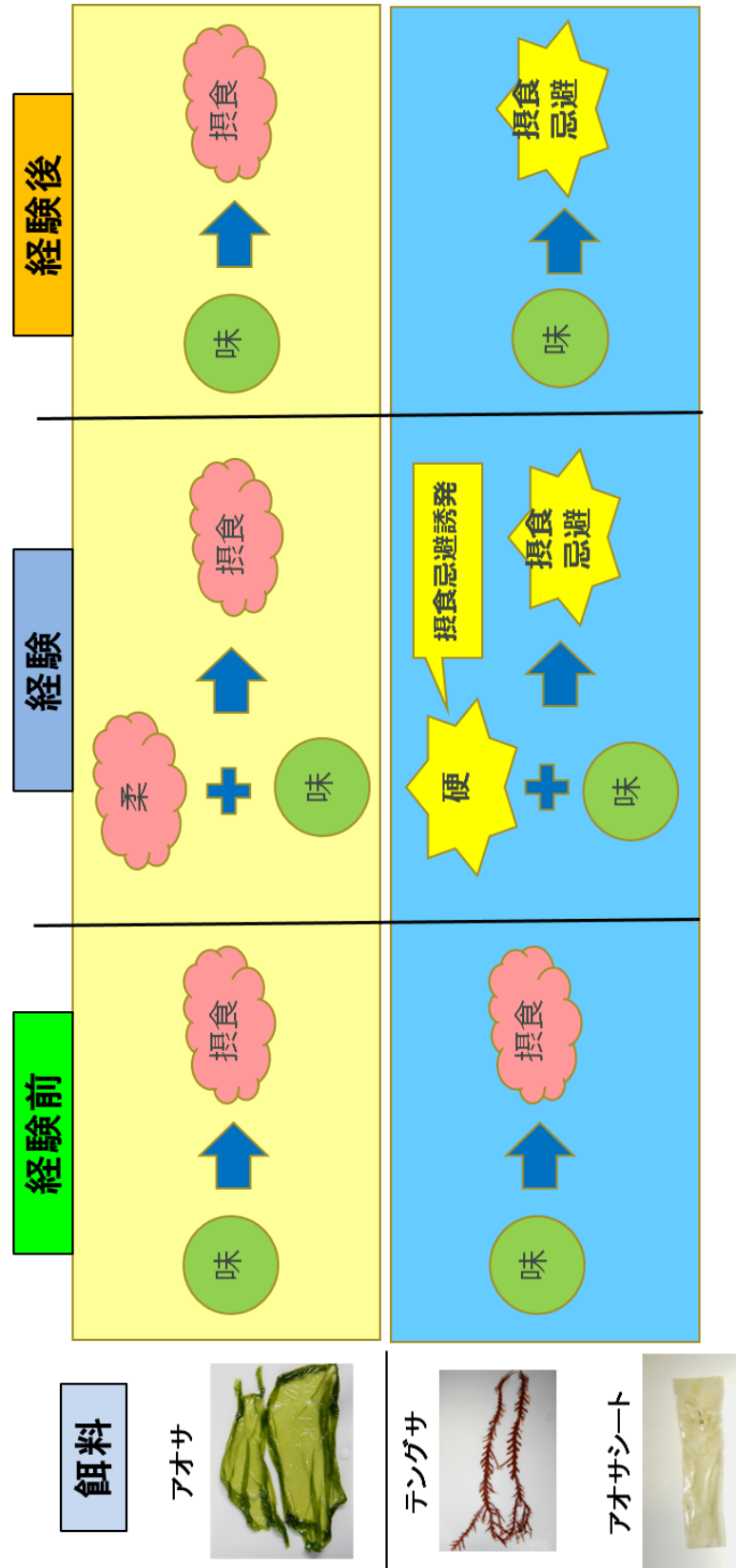


Fig. 2

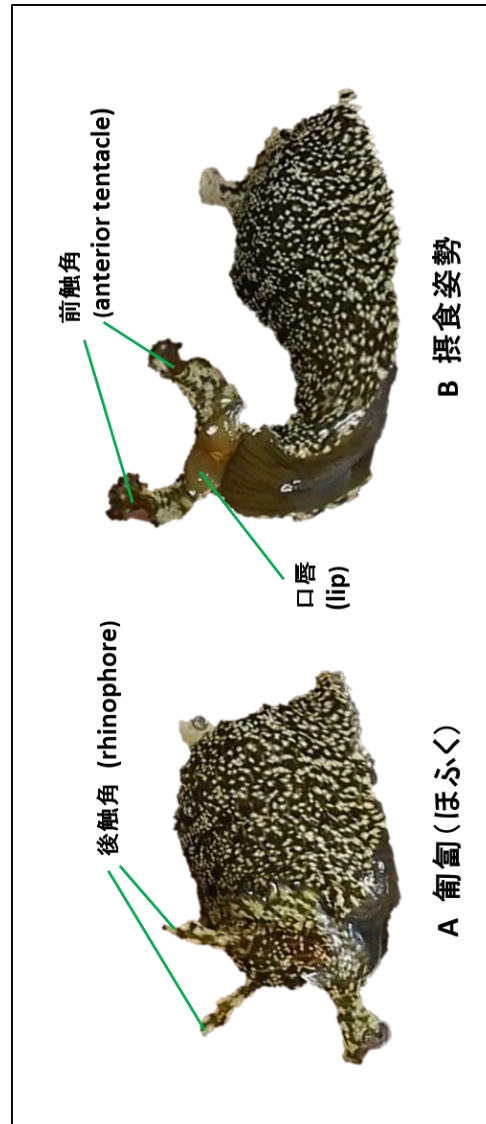


Fig. 3

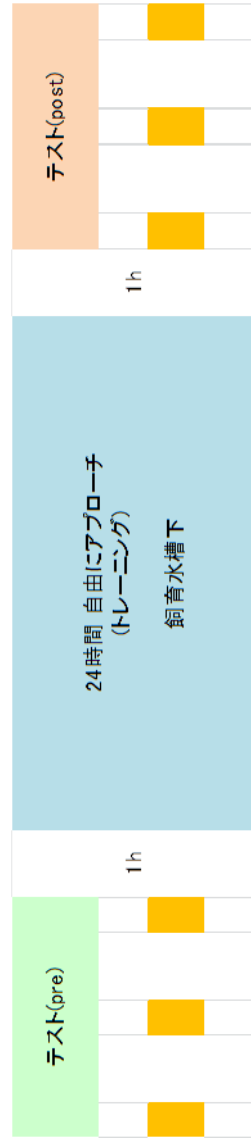


Fig. 4

No.	テスト(pre)			テスト(post)			テスト(4day)		
	1回目	2回目	3回目	1回目	2回目	3回目	1回目	2回目	3回目
1	A	A	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2	A	A	A	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3	A	A	A	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4	A	A	A	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5	NA	A	NA						
6	NA	NA	NA						
7	A	A	NA						
8	NA	NA	NA						
9	A	A	A						
10	A	A	NA						
11	A	NA	A						
12	A	A	E						
13	NA	NA	E						

Fig. 5

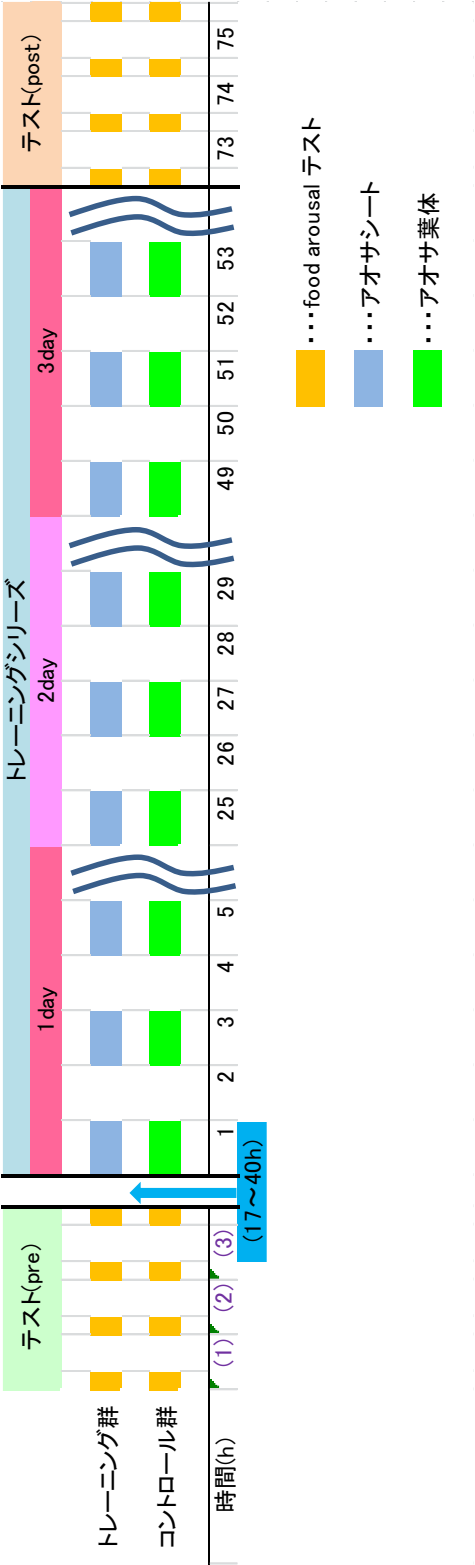


Fig. 6

トレーニング シリーズ				テスト(pre)				テスト(post)				テスト(7day)						
個体No.				1回目	2回目	3回目	4回目	1回目	2回目	3回目	4回目	1回目	2回目	3回目	4回目			
トレーニング 群				1	A	A	A	A	A	A	A	A	NA	NA	NA	NA		
				2	A	A	A	A	A	A	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
				3	A	A	A	A	A	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
				4	A	A	A	A	A	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
				5	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
				6	A	A	A	A	A	NA	NA	NA	NA	A	A	A	A	
				7	A	A	A	A	A	NA	NA	NA	NA	A	A	A	A	
				8	A	A	A	A	A	NA	NA	NA	NA	A	A	A	A	
				9	A	A	A	A	A	NA	NA	NA	NA	A	A	A	A	
				10	A	A	A	A	A	NA	NA	NA	NA	A	A	A	A	
				11	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
				12	A	A	A	A	A	NA	NA	NA	NA	A	A	A	A	
コントロール 群				個体No.	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
				1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
				2	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
				3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
				4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
5	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			

図の説明

Fig. 1

仮説：食物嗜好性は化学刺激と機械刺激の連合学習で成立する

上段：アオサの味(化学刺激)は摂食忌避を誘発しないため、経験前は味で摂食が起こる。アオサ葉体の柔らかい機械刺激(柔)は摂食忌避を誘発しないため、アオサ葉体を経験後も味のみで摂食が起こる。

下段：テングサの味(化学刺激)は摂食忌避を誘発しないため、経験前は味で摂食が起こる。テングサ葉体がもつ硬くてトゲトゲした機械刺激(硬)は摂食忌避を誘発するため、「硬」と味を連合学習した結果、経験後はテングサ葉体の味のみで摂食忌避が生じる。引きちぎりにくい人工餌料であるアオサシートでも同様のことが起こる。

Fig. 2

アメフラシの後触角(rhinophore)、前触角(anterior tentacle)、口唇(lip)を示した図

左図は匍匐(ほふく)を行っている様子。右図は腹足の前部分を持ち上げて摂食姿勢を取っている様子。

Fig. 3

テングサ葉体での学習実験のプロトコル

1時間のインターバルでテスト(pre)を各個体3回ずつ行い、1時間のrestをはさんだ後、飼育水槽内にテングサ葉体を入れて24時間自由にアプローチさせた(トレーニング)。トレーニング終了後1時間のrestをはさんだ後、1時間のインターバルでテスト(post)を各個体3回ずつ行った。

Fig. 4

テングサ葉体での学習実験結果

摂食行動の前段階の行動である Food arousal の有無をトレーニング前後で測定し、テングサ葉体への嗜好性の変化を検証した。A は Arousal で即ち Food arousal が起きたこと、NA は Not arousal で即ち Food arousal が起きなかったこと、E は Egestion (吐き出し) が起きたことをそれぞれ示す。

Fig. 5

アオサシートを用いた連合学習実験のプロトコル

1 時間のインターバルでテスト(pre) を各個体 4 回ずつ行った。テスト(pre) 終了からトレーニングシリーズ開始までは 17~40 時間空けた。1 時間実験容器内でアオサシート(トレーニング群)またはアオサ葉体(コントロール群)に自由にアプローチさせるのをトレーニングとした。1 日当たり 3 回のトレーニングを 1 時間の rest を挟んで行い、それを 3 日間繰り返した。この一連のトレーニングがトレーニングシリーズである。各日でトレーニング開始時刻を揃えた。テスト(post)は各日のトレーニング開始時刻と同時刻から開始し、1 時間のインターバルで各個体 4 回ずつ行った。

Fig. 6

アオサシートでの学習実験結果

摂食行動の前段階の行動である Food arousal の有無をトレーニング前後で測定し、アオサ葉体への嗜好性の変化を検証した。A, NA は Fig.4 と同じ。テスト(7 day) の空欄(No.1, 5, 11)はテストを行っていないことを示す。